DOI:10.11931/guihaia.gxzw202409014

冬枣 cDNA 三框表达文库构建及 *ZjRWD*40 基因上游调控因子的筛选

王嘉琪[1]，王惠冉[1]，王佳伟[1,3]，周军[1,2]，任玉锋[1,2]，徐文娣[1,2,*]，张琨[1]，乔帅[1]，张智凯[1]

（1. 北方民族大学 生物科学与工程学院，银川 750021；2. 宁夏经济林遗传改良创新团队，银川 750021；3. 甘肃连城国家级自然保护区管理局，兰州 730333）

摘　要：冬枣是重要的以食代药鲜食水果，*RWD*40 通过调节 DNA 甲基化水平影响下游基因表达和调控果实发育，进而影响果实风味品质。RWD40 蛋白是参与甲基化调控途径的关键蛋白，为了揭示冬枣中何种上游蛋白调控 *RWD*40 基因的表达，该研究利用酵母单杂交初步筛选冬枣 *ZjRWD*40 基因的上游候选调控因子。结果表明：（1）冬枣 cDNA 三框表达文库的滴度为 4×10^{9} CFU·mL^{-1}，重组率为 100%。（2）从冬枣 *ZjRWD*40 基因家族启动子区筛选了应激防御元件 ABRE、MBS 和 TGACG-motif，分别以其诱饵序列构建诱饵载体，命名为 Bait1-ABRE、Bait2-MBS 和 Bait3-TGACG-motif。（3）酵母单杂交筛选上游调控因子的结果显示，Bait1-ABRE 具有自激活现象，Bait2-MBS 和 Bait3-TGACG-motif 诱饵载体初步调取 11 条基因序列，其中 5 条与植物抗逆反应直接相关，它们可能通过与 MBS 元件和 TGACG-motif 元件互作，来调控冬枣 *ZjRWD*40 基因的表达，进而调控冬枣的 DNA 甲基化水平，为揭示 *ZjRWD*40 基因调控冬枣果实发育分子网络机制提供一定的参考。

关键词：冬枣(*Zizyphus jujuba* cv. ‘Dong zao’)，*RWD*40 基因，cDNA 文库，酵母单杂交，顺式作用元件

中图分类号：Q943　　　　　　　　**文献标识码：**A

Construction of three-frame expression library of *Zizyphus jujuba* cv. ‘Dong zao’ cDNA and screening of upstream regulator factors of *ZjRWD*40 gene

WANG Jiaqi[1], WANG Huiran[1], WANG Jiawei[1,3], ZHOU Jun[1,2], REN Yufeng[1,2], XU Wendi[1,2*], ZHANG Kun[1], QIAO Shuai[1], ZHANG Zhikai[1]

(1. *School of Biological Science and Engineering, North Minzu University,* Yinchuan 750021, China；2. *Innovation Team for Genetic Improvement of Economic Forest,* Yinchuan 750021, China；3. *Gansu Liancheng National Nature Reserve Administration,* Lanzhou 730333, China）

Abstract: *Zizyphus jujuba* cv. ‘Dong zao’, a late-maturing fresh-eating jujube variety unique to China, features tender flesh, abundant juice and minimal residues. It is not only nutritionally rich but also has the value of serving as a medicinal substitute, making it highly popular among consumers. DNA methylation, as an important epigenetic modification method, plays a core role in plants' response to stress and the process of fruit development. The RWD40 protein is a key protein involved in the methylation regulation pathway. It affects the expression of a series of downstream genes by regulating the DNA methylation level, and thus has a profound impact on the development process of fruits, the synthesis and accumulation of flavor substances, etc., ultimately affecting the fruit quality. However, the molecular mechanism regulating the expression of the *RWD*40 gene remains unclear. This study employed the yeast one-hybrid technique to preliminarily screen for upstream candidate regulatory factors of the *ZjRWD*40 gene. The results were as follows: (1) The titer of the three-frame expression library of *Zizyphus jujuba* cv. ‘Dong zao’ cDNA reached 4×10^{9} CFU·mL^{-1}, and the recombination rate was 100%. (2) Stress-defense elements ABRE, MBS, and TGACG-motif were identified from the promoter region of the *ZjRWD*40 gene family, and bait vectors Bait1-ABRE, Bait2-MBS, and Bait3-TGACG-motif were constructed respectively. (3) The results of screening upstream regulatory factors through yeast one-hybrid showed that Bait1-ABRE exhibited a self-activation. A total of 11 gene sequences were initially retrieved from the Bait2-MBS and Bait3-TGACG-motif bait vectors. Among them, 5 sequences were directly related to plant stress-resistance responses. The proteins encoded by these

---

基金项目：国家自然科学基金（32060669）；经济林遗传改良创新基金项目（2022QCXTD04）；第六批宁夏青年科技人才托举工程；北方民族大学研究生创新项目（YCX24138）。

第一作者：王嘉琪（2000—），硕士研究生，主要从事植物遗传育种研究，(E-mail) wjq01181128@163.com。

[*]**通信作者：**徐文娣，博士，讲师，研究方向植物遗传育种，(E-mail) xuwendi2018@nmu.edu.cn。

genes may regulate the expression of the *ZjRWD*40 gene through interactions with the MBS element and the TGACG-motif element, thus affecting its growth, development, and fruit quality under stress environments. This study provides important insights into the molecular network mechanism by which the *ZjRWD*40 gene regulates the fruit development of *Zizyphus jujuba* cv. 'Dong zao', and also lays a theoretical foundation for the stress-resistant breeding of *Zizyphus jujuba* cv. 'Dong zao'. Future research will focus on using transcriptome sequencing technology to identify the downstream regulatory genes of *ZjRWD*40, aiming to further clarify its molecular pathway in the stress regulation of *Zizyphus jujuba* cv. 'Dong zao'.
Key words: *Zizyphus jujuba* cv. 'Dong zao', *RWD*40 gene, cDNA library, Yeast one-hybrid, *cis*-acting original

冬枣（*Zizyphus jujuba* cv. 'Dong zao'）为鼠李科（Rhamnaceae）枣属（*Zizyphus* Mill.）植物，肉质细嫩爽脆，汁多渣少，是中国特有的晚熟鲜食枣品种（陈爱香，2011）。冬枣是一种营养丰富的水果，也是中国最受欢迎的水果之一，在大约 6 万 hm^2 的耕地上，每年生产约 2.5×10^8 kg（Huang et al., 2023)。冬枣从开花到果实成熟大约需要三个半月时间，根据冬枣果皮颜色的变化可将其分为三个阶段：白熟期、半红期和全红期。前期研究发现，枣果风味品质的形成主要受水分、光照和温度等环境因素的影响，然而干旱胁迫严重影响果实品质和产量，在冬枣果实成熟过程中，冬枣花期遇干旱则坐果率显著下降，幼果期遭遇干旱则果实变小，生长后期遭遇干旱则品质降低。干旱胁迫下，植物需要快速调整自身的基因表达模式以适应环境变化，DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传修饰方式，在调控基因表达中发挥着关键作用。已有研究表明，影响抗旱胁迫的甲基化水平变化最显著的基因是 *RWD*40 基因，在水稻中，敲除 *RWD*40 基因的水稻植株对干旱胁迫更为敏感，表现出叶片萎蔫早、生长受抑制程度大等现象，进一步证明了 *RWD*40 基因在植物应对干旱胁迫中的重要作用（Eryong et al., 2022）。干旱胁迫通过影响 DNA 甲基化水平，进而影响了其遗传性状的改变，使果实品质等产生了差异（张春玉，2013）。但在冬枣中具体哪些上游因子调控 *RWD*40 基因响应干旱等胁迫尚不明确，因此，探究 *RWD*40 的分子调节机制对冬枣抗旱育种有重要意义。

在拟南芥中，RWD40 蛋白能够作为中间体与 *ROS*1 去甲基化酶和 RMB1 或 RHD1 结合成为 WD40 复合体，与调节去甲基化（Liu et al., 2021；王惠冉等，2024），因此 *RWD*40 基因可通过形成复合体参与植物 DNA 主动去甲基化过程，进而影响植物在干旱胁迫下的 DNA 甲基化状态。近年来，大量研究证明 *WD*40 参与了干旱、盐等逆境胁迫响应，但目前该方面的研究仅在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）等模式植物中较深入（华静静等，2015；杨述章等，2015）。闫诚（2005）通过比较干旱和 ABA 处理下突变体的叶片失水率、气孔大小、密度等指标变化，证明具有 WD40 重复结构的 *AtARCA* 与 *AtAGB*1 均参与了干旱胁迫信号转导过程。在棉花中，*GhWD*40 基因超表达降低了植株对盐和干旱的耐受性，表明 *GhWD*40 参与并负调了拟南芥响应盐和干旱胁迫途径（李洁，2013）。

在植物中，*WD*40 基因对于植物的生长发育具有重要意义，比如在花青素合成、分生组织形成、幼苗发育、花发育、光信号传递和感知等方面发挥作用，在植物的发育和生理过程中也起着重要作用（Ji et al.，2022）。在多刺绿绒蒿中，*WD*40 基因启动子区存在很多逆境响应元件，表明其可能参与调节植物生长、发育、次生代谢物积累等（任玉玲等，2022）；在辣椒果实中，*CaMYBA* 和 *CaWD*40 基因被病毒介导的基因独立沉默，结构基因的转录水平及花青素含量出现了相似的下降（Ohno et al.，2020）；在番茄中，*WD*40 家族基因 *SlWDR*204 过表达转基因植株茎秆长度增长（张琳等，2021）。已有研究关于 DNA 甲基化调控果实发育及成熟的作用机制（邵凤清等，2023），前人研究发现的拟南芥中 WD40 复合体，其中 RWD40 起到了连接 ROS1 与其他蛋白的关键作用（Liu et al.，2021），WD40 蛋白能够感知组蛋白修饰的变化，并将信号传递给 DNA 甲基化相关蛋白，从而触发相应的 DNA 甲基化或去甲基化反应（Valentina et al.，2012），当组蛋白 H3 的赖氨酸残基发生甲基化修饰时，WD40 蛋白可能识别这种修饰，并促使与之结合的 DNA 甲基转移酶或去甲基化酶发挥作用，调整 DNA 甲基化水平，进而影响基因的表达和植物的生长发育（张淼等，2022）。因此研究 *RWD*40 基因分子调节机制对于冬枣响应干旱胁迫及参与 DNA 甲基化调控具有重要意义。

目前已有许多研究表明表观遗传调控果实成熟的作用机制，但对于冬枣的 DNA 甲基化对其生长发育调控机制研究较少，另外，针对 *RWD*40 基因在干旱胁迫下如何影响冬枣 DNA 甲基化的具体分子机制研究相对较少，还需要进一步研究揭示其在干旱胁迫响应中的具体作用机制和生物学功能。本研究首先构建了冬枣叶片和

果实全长 cDNA 文库，而后运用酵母单杂交技术，选取 *ZjRWD*40 基因家族启动子区的三个顺式作用元件为诱饵，初步筛选调控 *ZjRWD*40 基因表达的上游调控蛋白，为进一步研究 *ZjRWD*40 基因分子机制及调控冬枣果实发育提供一定参考，同时为冬枣抗旱育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

本研究所用植物材料为 3 年生冬枣，以酸枣（*Ziziphus jujuba* var. *spinose*）作为嫁接砧木，种植于北方民族大学物研所（106° 10′ E、38° 29′ N），光照周期 12 h▪d^{-1}、光照强度 150 μmol▪m^{-2}▪s^{-1}。分别于 2023 年 5 月至 9 月份，每隔 10 d，采集自然状态下冬枣叶片和果实组织材料，将采集的幼叶、老叶及白熟期、半红期、全红期果实分别混样，含 3 次生物学重复，于-80 ℃冰箱备用。

1.2 研究方法

1.2.1 cDNA 合成与均一化　提取 RNA 约 1 μg，使用 SMART 法进行 cDNA 第一链合成，经过 PCR 扩增得到双链 cDNA，取 5 μL cDNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，检测 cDNA 合成效果，对纯化后的 cDNA 进行均一化处理，随后进行 PCR 扩增并电泳检测，获得均一化 cDNA。利用限制性内切酶 *Sfi* I 酶切处理 cDNA 后使用凝胶过滤树脂填充的离心柱（缓冲液：Tris-EDTA Buffer）进行过柱处理，去除短片段，再用酚、氯仿、异戊醇（25∶24∶1）处理（张琨等，2023），ddH$_2$O 溶解获得去除短片段的 cDNA，取 1 μL cDNA 电泳检测去除效果。

1.2.2 cDNA 文库构建及质粒提取　将过柱后 cDNA 和 pGADT7 三框载体于 12 ℃条件下过夜连接，并纯化连接液，获得初级 cDNA 文库。取 1 μL 连接液 1.8 kV、200 Ω、25 μF 条件下电转化感受态细胞 HST08，取适量转化液涂布于含有氨苄青霉素(ampicillin, Amp)抗性的 LB 平板，37 ℃过夜培养，统计菌落数量，检测初级文库库容，初级文库库容 = 平板菌落数/10 μL × 稀释倍数(100 倍) × 连接液总体积（mL），再随机挑取菌落，利用 pGADT7 引物进行菌液 PCR 检测插入片段长度（张琨，2022）。初级 cDNA 三框表达文库连接液混合后电转化至感受态细胞 HST08，涂布 LB 平板，回收扩增菌落并提取质粒，取 1 μL 电泳检测扩增文库质粒效果，保留 40 mL 扩增文库甘油菌。

1.2.3 冬枣 *ZjRWD*40 基因家族顺式作用元件预测　从拟南芥数据库获取 *AtRWD*40 基因序列，通过 NCBI 获得枣的全基因组和基因组结构注释文件，利用 TBtools 进行序列比对，得到冬枣 *ZjRWD*40 基因家族。提取冬枣 *ZjRWD*40 基因家族转录起始位点上游 1 500 bp 启动子区序列，Plant CARE 预测 *ZjRWD*40 基因家族启动子顺式作用元件，选择三个与胁迫相关的顺式作用元件做诱饵序列，即 Bait1、Bait2、Bait3，用于后续酵母单杂交分析。

1.2.4 Bait 酵母菌株构建及最低 AbA 抗性检测　分别将三个 Bait 序列前后各扩增两个碱基，进行三次串联重复，构建到 pAbAi 质粒 *Sac* I/*Sal* I 位点间，电泳检测连接效果，选取条带大小正确的质粒测序，将测序正确的 Bait 质粒用 *Bbs*I 限制性内切酶线性化处理，电泳检测酶切效果。切胶纯化回收后，转入 Y1HGold 菌株中，涂布 SD/-Ura 平板，获得含有诱饵序列的 Bait1-ABRE 菌株、Bait2-MBS 菌株、Bait3-TGACG-motif 菌株。分别取适量菌液至 1 mL 0.9% NaCl 中，分光光度计测定 OD_{600} 值，稀释至 OD_{600} 值约 0.002，取 100 μL 菌液涂布含有不同浓度金担子素 A（Aureobasidin A，AbA）的 SD/-Ura/AbA 平板，检测 3 个菌株最低 AbA 抗性。

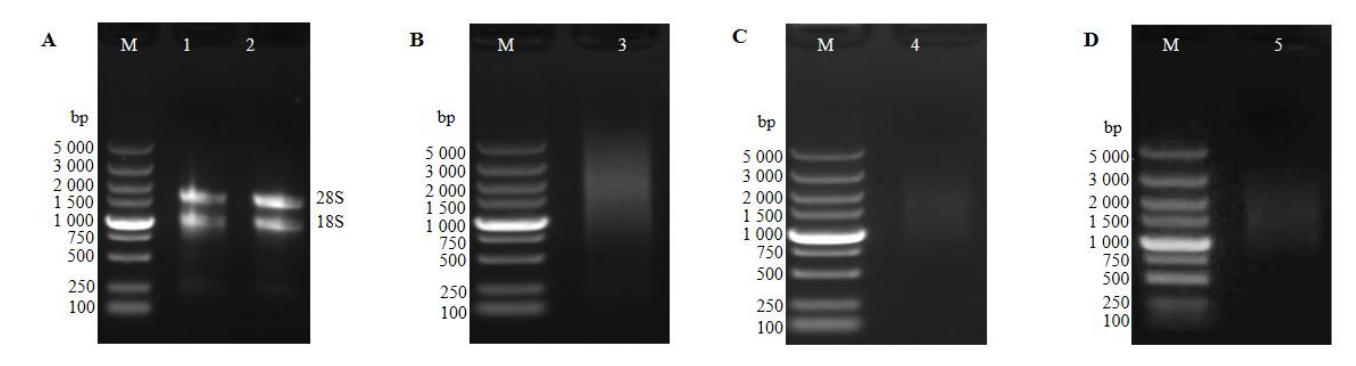
1.2.5 酵母单杂交筛选互作蛋白　分别取 20 μg 文库质粒，使用 Yeastmaker 酵母转化酶试剂盒（Takara，宝日医生物技术有限公司）将质粒转化到 Y1HGold-Bait 酵母菌中，分别获得 15 mL 悬浮菌液。分别取少量悬浮液进行 1/10、1/100 稀释，涂 100 μL 至 100 mm 的监控平板 SD/-Leu，计算筛选克隆的总量。将剩余悬浮液涂布 50 个 150 mm 的 SD/-Leu/AbA (300 ng·mL^{-1}) 平板，30℃培养 5 天。对两个筛选平板中正常生长的菌落转移至新的 SD/-Leu/AbA (300 ng·mL^{-1}) 平板上，进一步培养确认。

1.2.6 阳性克隆测序及候选蛋白功能分析　挑取阳性克隆菌落进行菌液 PCR，电泳检测产物条带大小，回收特异条带，个别样品回收两条主带进行测序，将结果在 NCBI 进行 BLASTn 比对，去掉无效序列后在 UniProt 上进行功能注释（王惠冉等，2024）。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

冬枣叶片和果实总 RNA 质量良好（图 1：A），合成的 cDNA 长度在 500~ 5 000 bp 之间（图 1：B），对合成的 cDNA 均一化处理和去除短片段后，结果显示 cDNA 范围缩小至 700 ~ 2 500 bp（图 1：C、D），说明已有效去除小于 500 bp 杂质片段。



A. 叶片和果实总 RNA；**B**. cDNA 合成；**C**. cDNA 均一化；**D**. cDNA 短片段去除；**M**. DL5 000 Marker。

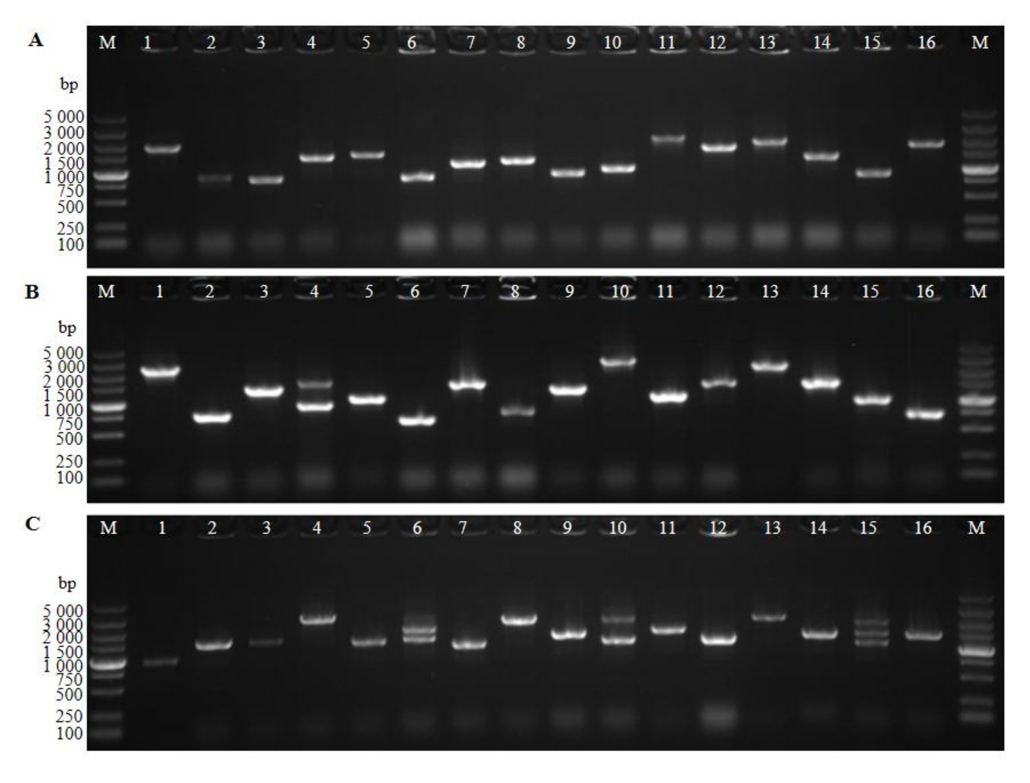
A. Total RNA of leaves and fruits; **B**. Synthetic cDNA; **C**. cDNA homogenization; **D**. Purifying of the cDNA; **M**. DL5 000 Marker.

图 1 冬枣叶片和果实总 RNA 提取、cDNA 合成和均一化处理

Fig.1 RNA extraction and cDNA synthesis from *Zizyphus jujuba* cv. ‘Dong zao’ leaves and fruits

2.2 cDNA 文库构建与插入片段检测及质粒提取

通过计算获得 3 个读码框初级文库库容均为 1.5×10^6 CFU，随机挑取 16 个菌落进行菌液 PCR，检测插入片段长度。由图 2 可知，所有克隆条带均单一，插入片段长度 400~2 000 bp，均长 1 000 bp，重组率达 100% ，表明构建的 cDNA 文库质量良好。将 3 种读码框初级文库平板上生长的菌落混合，转化感受态细胞并提取质粒，结果显示文库质粒大小符合预 2 500~5 000 bp 之间，可用于后续酵母单杂交筛选实验。



A-C. 读码框 1-3；**M**. DL5 000 Marker；**1-16**. 每个读码框挑取 16 个菌落。

A-C. Frame of reading 1-3; **M**. DL5 000 Marker; **1-16**. 16 colonies per frame of reading.

图 2 插入片段检测

Fig.2 Determination of the inserted cDNA segments

2.3 冬枣 *ZjRWD*40 基因家族顺式作用元件预测

*ZjRWD*40 基因家族启动子顺式作用元件预测显示，其主要包括 CAAT-box、TATA-box，光响应的元件，激素响应元件，生长发育响应元件以及与干旱胁迫相关的应激防御响应元件等（表 1），本研究选取了 3 个顺式作用元件 ABRE（tgACGTGgc，脱落酸响应元件）、MBS（agCAACTGca，干旱应答元件）和 TGACG-motif（atTGACGaa，茉莉酸甲酯反应元件）作为酵母单杂交的诱饵序列进行筛选。

表 1 *ZjRWD*40 基因顺式作用元件分析

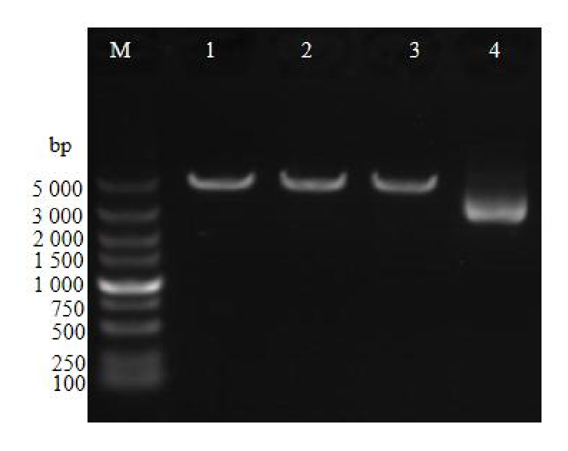
Table 1 Analysis of gene *cis*-acting elements of *ZjRWD*40

元件名称 Element name	元件序列 Element sequence	功能 Function	备注 Remark
ACE	CTAACGTATT	参与光反应的顺式作用元件 *Cis*-acting elements involved in photoreaction	光响应元件 Light responsive element
ATCT-motif	AATCTAATCC	参与光反应的保守 DNA 模块的一部分 A part of the conserved DNA module involved in photoreaction	
TCT-motif	TCTGTTG	光响应元件的一部分 A part of the photoresponsive element	
GT1-motif	CCTTTTG	光响应元件 Photoresponsive element	
AE-box	TGACG	光响应模块的一部分 Part of the photoresponsive module	
G-Box	CACGTC	参与光反应的顺式调控元件 *Cis*-regulatory elements involved in photoreaction	
ABRE	ACGTG	参与脱落酸反应的顺式作用元件 *Cis*-acting elements involved in abscisic acid reaction	激素响应元件 Hormone responsive element
TGACG-motif	TGACG	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory elements involved in the reaction of methyl jasmonate	
TGA-element	AACGAC	生长素反应元件 Auxin responsive element	
ARE	TGTCTCAATAAG	厌氧诱导所必需的顺式调控元件 The necessary *cis*-regulatory elements for anaerobic induction	生长发育响应元件 Growth and development response element
O2-site	GGTCCAT	玉米醇溶蛋白代谢调控中的顺式调控元件 *Cis*-regulatory elements in the regulation of zein metabolism in maize	
MBS	CAACTG	MYB 结合位点参与干旱诱导 MYB binding sites participate in drought induction	应激防御响应元件 Stress defense response element
CAAT-box	AACCTAA	启动子和增强子区的常见顺式作用元件 Common *cis*-acting elements in promoter and enhancer regions	启动子序列均有的基本元件 The basic elements that are present in all promoter sequences
TATA-box	ACGTG	启动子核心元件 Core promoter element around -30 of transcription start	

2.4 Bait 菌株构建及 AbA 抗性自激活检测

将选定的三条 Bait 序列进行三次串联重复，分别构建于 pAbAi 质粒 *Sac* I/*Sal* I 位点间，电泳结果显示三条 Bait 序列质粒线性化大小均大于 5 000 bp，表明三条 Bait 序列已成功构建到 pAbAi 质粒中（图 3），将构建好的质粒转入 Y1HGold 菌株，涂布 SD/-Ura 平板，可以得到菌株 Y1HGold-Bait1、Y1HGold-Bait2、Y1HGold-Bait3。

3 个菌株的最低 AbA 抗性检测结果表明，Bait1 菌株在不同浓度 AbA 的 SD/-Ura 平板上均有大量菌落生长，说明 Bait1 自激活现象严重，背景无法抑制，不能用于筛选（图 4：A）；Bait2 菌株和 Bait3 菌株在不同浓度 AbA 的 SD/-Ura 平板上菌落数量不同，Bait2 菌株在 SD/-Ura 平板和 SD/-Ura with AbA (100 ng·mL^{-1}) 上有大量菌落生长且长菌数量均大于 2 000，SD/-Ura with AbA (200 ng·mL^{-1}) 平板上有 1 个菌落生长（图 4：B）；Bait3 菌株在 SD/-Ura 平板上有大量菌落生长且长菌数量均大于 2 000，在 SD/-Ura with AbA (100 ng·mL^{-1}) 上有 3 个菌落生长（图 4：C），说明 Bait2 菌株和 Bait3 菌株均未发生自激活现象，同时选择 AbA 300 ng·mL^{-1} 作为 Bait2 菌株和 Bait3 菌株的筛选浓度。

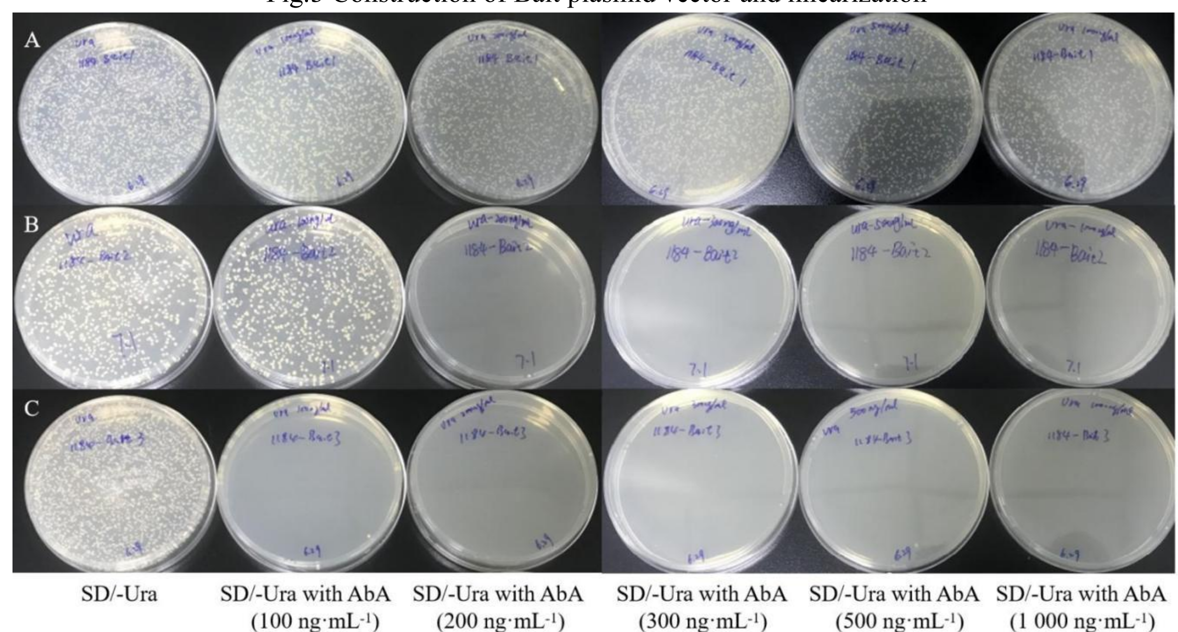


M. DL5 000 Marker；**1**. Bait1 质粒线性化；**2**. Bait2 质粒线性化；**3**. Bait3 质粒线性化；**4**. 对照质粒。

M. DL5 000 Marker; **1**. Linearization of Bait1 plasmid; **2**. Linearization of Bait2 plasmid; **3**. Linearization of Bait3 plasmid; **4**. Control plasmid.

图 3 诱饵质粒载体构建及线性化

Fig.3 Construction of Bait plasmid vector and linearization



A. Bait1 菌株；**B**. Bait2 菌株；**C**. Bait3 菌株。

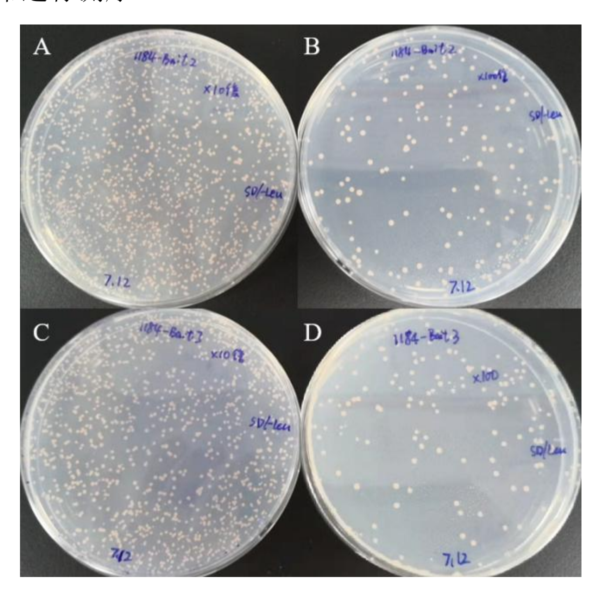
A. Bait1 strain; **B**. Bait2 strain; **C**. Bait3 strain.

图 4 Bait 菌株 AbA 抗性自激活检测

Fig.4 Autoactivation detection of AbA resistance in Bait strain

2.5 酵母单杂交筛选上游互作蛋白

取 20 μL 文库质粒分别转化到 Y1HGold-Bait2、Y1HGold-Bait3 酵母菌中各获得 15 mL 悬浮菌液。分别取少量悬浮液进行 1/10、1/100 稀释，涂布监控平板 SD/-Leu，计算筛选克隆总量（图 5），计算得稀释 1/100 后 Bait2 菌株筛选覆盖克隆总量为 270 万[180 × 100（稀释倍数）× 10（100 μL 涂菌相当于 0.1 mL）×15（总菌量 15 mL）=270 万]，Bait3 菌株筛选覆盖克隆总量 240 万[160 × 100（稀释倍数）× 10（100 μL 涂菌相当于 0.1 mL）×15（总菌量 15 mL）=240 万]。分别挑取两个筛选平板中正常生长的阳性菌落转移至新的 SD/-Leu/AbA (300 ng·mL^{-1}) 平板进一步培养确认（图 6）。将平板中仍正常生长的 48 个阳性克隆菌落做菌液 PCR 检测，结果显示 Bait2 阳性克隆基因大小在 500～2 000 bp 之间，Bait3 阳性克隆基因大小在 500～3 000 bp 之间（图 7），切胶回收特异条带进行测序。

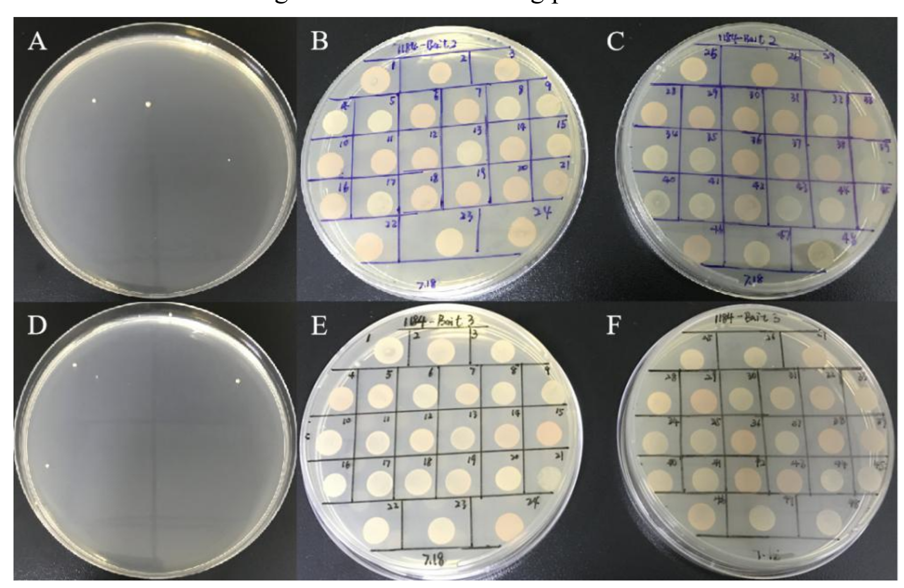


A. Bait2 稀释 10 倍；**B**. Bait2 稀释 100 倍；**C**. Bait3 稀释 10 倍；**D**. Bait3 稀释 100 倍。

A. Bait2 diluted 10 times; **B**. Bait2 diluted 100 times; **C**. Bait3 diluted 10 times; **D.** Bait3 diluted 100 times.

图 5 SD/-Leu 监控平板

Fig.5 SD/-Leu monitoring plate

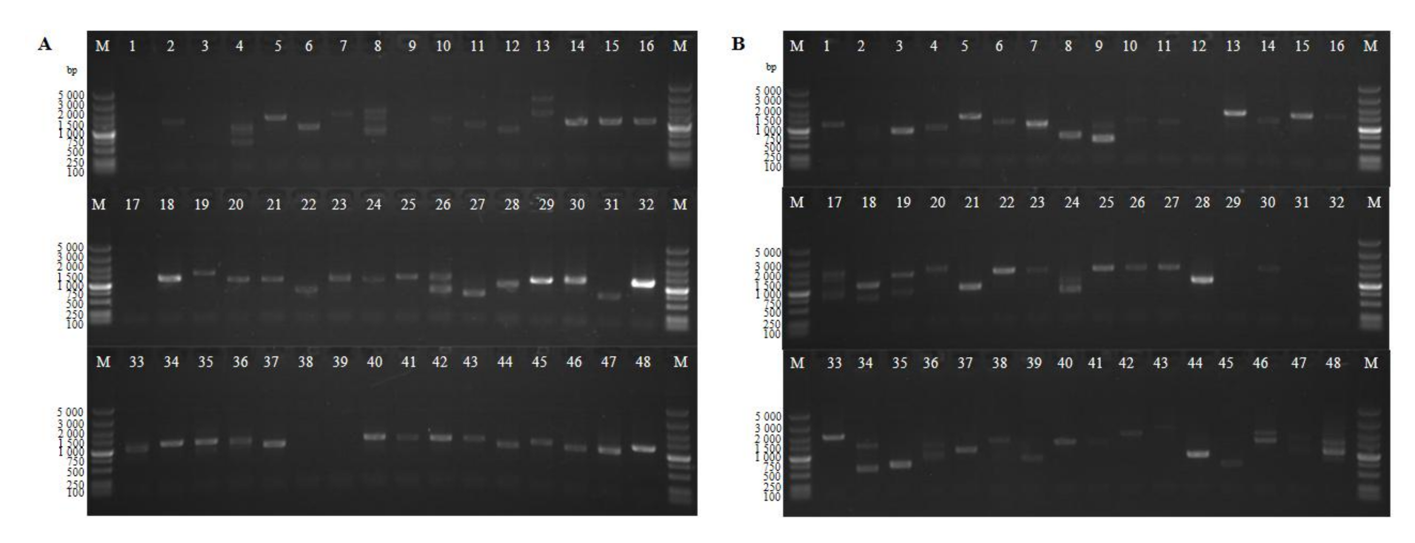


A. Bait2 第一次筛选；**B**、**C**. Bait2 第二次筛选；**D**. Bait3 第一次筛选；**E**、**F**. Bait3 第二次筛选。

A. Bait2 first screening; **B**, **C**. Bait2 second screening; **D**. Bait3 first screening; **E**, **F**. Bait3 second screening.

图 6 酵母单杂交筛选

Fig.6 Screening of yeast one-hybrid



A. Bait2 阳性克隆 PCR；**B**. Bait3 阳性克隆 PCR；**M**. DL5 000 Marker；**1-48**.48 个阳性克隆菌落菌液 PCR。

A. Bait2 positive clone PCR; **B**. Bait3 positive clone PCR; **M**. DL5 000 Marker; **1-48**. PCR of the bacterial liquid from 48 positive cloned colonies.

图 7 阳性克隆 PCR 检测

Fig.7 PCR detection of positive clones

2.6 测序结果 BLAST 比对分析

将阳性克隆测序结果在 NCBI 上进行 BLASTn 比对，结果如表 2 所示。候选互作蛋白包括参与植物生长发育的转录因子、参与信号转导的转录因子及参与抗逆防御的转录因子，结果表明这些转录因子可能通过与 MBS 元件和 TGACG-motif 元件互作来调控 *RWD*40 基因的表达，进而调控胁迫条件下冬枣 DNA 甲基化水平。

表 2 阳性克隆测序结果分析

Table 2 Analysis of positive clone sequencing results

比对结果 Alignment result	功能注释 Functional annotation	NCBI 登录号 GenBank ID	备注 Note
驱动蛋白轻链相关蛋白 3 Kinesin light chain-associated Protein 3 (KLCAP3)	花粉管生长、调节防御反应的频率、速率或程度 Pollen tube growth, regulation of the frequency, rate or extent of a defense response	XP_015882592.2	Bait2 阳性克隆测序结果分析 Analysis of sequencing results of Bait2 positive clones
磷脂酰肌醇：神经酰胺肌醇磷酸转移酶 2 类似物 Phosphatidylinositol:ceramide inositol phosphotransferase 2-like (PITPNC2L)	通过促进鞘脂代谢，从而调节神经酰胺积累，可能在调节与防御相关的植物程序性细胞死亡（PCD）中发挥重要作用 By promoting sphingolipid metabolism and thus regulating ceramide accumulation, it may play an important role in regulating plant programmed cell death (PCD) related to defense	XP_048320018.1	
含 rho-N 结构域的蛋白质 1，叶绿体亚型 X1 Rho-N domain-containing protein 1, chloroplastic isoform X1	小 GTP 结合蛋白家族的一个亚族，调控着肌动蛋白的重组过程，参与 MAP 激酶细胞信号转导过程 A subfamily of the small GTP-binding protein family regulates the actin reorganization process and is involved in the MAP kinase cell signaling pathway	XP_015891265.2	
开花位点 K 同源域亚型 X2 Flowering Locus K Homology Domain Isoform X2 (FLK HD Isoform X2)	与 RNA 结合的蛋白质 RNA Binding Proteins	XP_015875416.1	

非特征蛋白 LOC1074236 Uncharacterized protein LOC107423619	基因产物与 DNA 选择性和非共价相互作用、转录协同调节活性 Gene products interact selectively and non-covalently with DNA and have transcriptional co-regulatory activity	XP_048335650.1	
假设蛋白质 FEM48_Zijuj06G00433008 Hypothetical protein FEM48_Zijuj06G00433008	香蕉枯萎病 Banana Fusarium wilt disease	KAH7523733.1	
磷脂酰肌醇：神经酰胺肌醇磷酸转移酶 2 类似物 Phosphatidylinositol: ceramide inositol phosphotransferase 2-like	通过促进鞘脂代谢，从而调节神经酰胺积累，可能在调节与防御相关的植物程序性细胞死亡（PCD）中发挥重要作用 By promoting sphingolipid metabolism and thus regulating ceramide accumulation, it may play an important role in regulating plant programmed cell death (PCD) related to defense	XP_048320018.1	Bait3 阳性克隆测序结果分析 Analysis of sequencing results of Bait3 positive clones
富含脯氨酸受体类似物蛋白激酶 PERK1 Proline-rich receptor-like protein kinase PERK1	内质网应激 Endoplasmic reticulum stress	XP_015898266.1	
PTI1 样酪氨酸蛋白激酶 At3g15890 PTI1-like tyrosine-protein kinase At3g15890	抗病免疫 Disease-resistant immunity	XP_015870433.1	
含 rho-N 结构域的蛋白质 1，叶绿体亚型 X1 Rho-N domain-containing protein 1, chloroplastic isoform X1	小 GTP 结合蛋白家族的一个亚族，调控着肌动蛋白的重组过程，参与 MAP 激酶细胞信号转导过程 A subfamily of the small GTP-binding protein family regulates the actin reorganization process and is involved in the MAP kinase cell signaling pathway	XP_015891265.2	
非特征蛋白 LOC107423619 Uncharacterized protein LOC107423619	基因产物与 DNA 选择性和非共价相互作用、转录协同调节活性 Gene products interact selectively and non-covalently with DNA and have transcriptional co-regulatory activity	XP_048335650.1	

3 讨论与结论

近年来，如何提高冬枣果实的口感和质量已成为冬枣生产中的突出问题。枣果口味和品质的形成主要与水分、光照和温度等环境因素有关，此外，枣果风味品质的形成还与自身相关基因的表达有关，这些基因受遗传和表观遗传的调控。就分子功能和生物学过程而言，WD40 蛋白通过分子相互作用广泛参与非生物胁迫反应、形态发育和植物次生代谢的调节等（赵艳等，2022）。

通过分析珍珠粟的 *PgWD*40 基因家族启动子，发现 *PgWD*40 基因与植物的生长发育相关，*PgWD*40 基因家族成员含有不同激素胁迫响应的顺式作用元件，表明该基因家族可能通过依赖不同激素的信号通路来调控和响应非生物胁迫（杨煜琛等，2024）。因此，本研究利用 Plant CARE 对 *ZjRWD*40 基因家族启动子顺式作用元件预测分析，发现其中有大量的与植物生长发育相关的顺式元件，如与分生组织表达相关调控元件、参与胚乳表达元件、参与栅栏叶肉细胞分化元件等（王惠冉等，2024），另外还存在多个激素相关的调控元件，如茉

莉酸甲酯响应元件、水杨酸响应元件、脱落酸响应元件等，在启动子上还发现有与生物和非生物胁迫相关的顺式作用元件，说明该基因家族可能还参与冬枣干旱胁迫、病害响应等。

为了研究 *ZjRWD*40 对冬枣果实发育及 DNA 甲基化的作用，本研究选取了参与脱落酸反应 (ABRE) 、参与干旱诱导 (MBS) 和参与茉莉酸甲酯 (TGACG-motif) 的三个顺式元件为诱饵序列筛选上游转录因子。将三条 Bait 序列构建到 pAbAi 质粒，导入酵母菌进行自激活检测，发现 Bait1 菌株不能用于筛选，原因可能是细胞内某些转录因子非特异性结合 ABRE 元件，或在特定条件下过量表达，增加结合机会从而引发激活。将 cDNA 文库质粒分别转入 Bait2 菌株、Bait3 菌株中进行筛选，将阳性克隆测序结果进行 BLAST 比对，比对结果表明有 5 条序列可能与植物抗逆性相关。

进一步分析这 5 条序列：Kinesin Light Chain-Associated Protein 3 (KLCAP3) 参与花粉管生长，调节防御反应的频率、速率或程度。在棉花中，*GhKLCR*1 基因编码一个驱动蛋白轻链相关蛋白，并通过实验证明了 *GhKLCR*1 参与了逆境胁迫响应（李婕，2018）。在干旱胁迫下，KLCAP3 可能参与调节与干旱响应相关的转录因子的活性或定位，从而调控下游抗逆基因的转录水平，使植物合成更多的抗逆蛋白和代谢产物，提高其抗旱能力。因此当冬枣面临环境压力，KLCAP3 蛋白可能会参与调节细胞内物质的重新分配，帮助冬枣适应不良环境。Phosphatidylinositol:ceramide inositol phosphotransferase 2-like (PITPNC2L) 可能在调节与防御相关的植物程序性细胞死亡中发挥重要作用，磷脂信号传导参与调节植物生长发育、信号转导、细胞对环境刺激等（宋洪星，2022），因此我们推测在冬枣生长发育过程中，会面临水分亏缺、细胞膜损伤等问题。该蛋白所参与的鞘脂代谢途径可能会影响植物细胞的渗透调节和膜的稳定性，有助于植物在干旱条件下维持细胞的膨压和正常的生理功能，从而提高植物的耐旱能力（Yang et al., 2024）。Proline-rich receptor-like protein kinase PERK1 参与内质网应激，在植物遭受逆境胁迫时，它能够作为一个感受器来感知外界的胁迫信号。在植物受到干旱胁迫时，PERK1 激活后可能通过调节细胞内蛋白质稳态来增强植物耐受性。研究发现，*PERK*1 基因过表达的植物在干旱处理后，脯氨酸含量相对较高，能够更好地维持叶片的相对含水量，减少叶片的萎蔫程度（Ren et al., 2018）。因此我们推测 PERK1 可能通过调节脯氨酸代谢相关的基因表达或蛋白活性，帮助冬枣在干旱环境中保持水分平衡。PTI1-like tyrosine-protein kinase At3g15890 参与抗病免疫，例如酪氨酸激酶家族成员 Src 和 Abl 通过多种机制参与病原微生物的感染（张佳鑫等，2019），因此推测当冬枣受到病原菌感染时，可能磷酸化并激活与抗菌物质合成相关的蛋白，促进冬枣产生植保素等抗菌化合物来抵御病原菌。在干旱条件下，PTI1-like tyrosine-protein kinase At3g15890 可能通过调节植物体内的渗透调节物质合成或相关信号转导途径，帮助植物维持细胞的膨压和水分平衡，从而提高植物对干旱的耐受性。该激酶不仅在植物抗逆反应中发挥作用，还可能参与植物的生长发育过程，并且与抗逆性之间存在协同调控关系。Rho-N domain-containing protein 1, chloroplastic isoform X1 是一种新型的核糖核酸结合蛋白，其 C 末端的螺旋-延伸-螺旋结构的 Rho-N 基序能够结合并支持特定叶绿体 RNA 的加工，对叶绿体基因的表达调控具有重要意义。当冬枣受到干旱胁迫时，体内的生理过程会受到影响，叶绿体功能可能受损，该蛋白可能通过维持叶绿体的稳定性和正常功能，确保光合作用等重要生理过程的持续进行，从而提高冬枣在干旱胁迫下的生存能力和耐受性，减少因干旱导致的生长抑制和损伤。

本研究构建了冬枣叶片和果实高质量 cDNA 文库，运用启动子区相关顺式作用元件为诱饵，用酵母单杂交技术对 cDNA 文库进行筛选，初步获得 5 条响应抗逆防御反应相关的转录因子，它们可能通过与 MBS 元件和 TGACG-motif 元件互作来调控 *ZjRWD*40 基因的表达。后续将通过转录组测序，寻找 *ZjRWD*40 下游调控基因，以完善该基因在冬枣抗旱胁迫调控中分子通路，也为下一步验证提供实验依据。

参考文献：

CHEN AX, 2011. Literatures analysis of jujube fruits in China [J]. Northern Horticulture, (23): 218-220. [陈爱香，2011. 中国冬枣文献分析 [J]. 北方园艺，(23)：218-220.]

ERYONG C, BO S, 2022. *OsABT*, a rice WD40 domain-containing protein,is involved in abiotic stress tolerance [J]. Rice Sci, 29:247-256.

HUANG XL, TIAN Y, XING JL, et al., 2023. Coexpression modules constructed identifies regulation pathways of

winter jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. 'Dongzao') following postharvest treatment with ozone [J]. Postharvest Biology and Technology, 197.

HUA JJ, CHEN XJ, 2015. Progress of WD40 proteins in plants [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, (5): 153-156. [华静静，陈晓静，2015. 植物体中 WD40 蛋白的研究进展 [J]. 黑龙江农业科学, (5)：153-156.]

JI XL, ZHANG MY, WANG D, et al., 2022. Genome-wide identification of *WD*40 superfamily in Cerasus humilis and functional characteristics of *ChTTG*1 [J]. International journal of biological macromolecules, 225.

LI J, 2013. Isolation and characterization of *GhWD*40 in cotton [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [李洁，2013. 棉花 *GhWD*40 基因的克隆及功能验证 [D]. 武汉：华中农业大学.]

LI J, 2018. Cloning and functional verification of a kinesin light-chain related gene *GhKLCR*1 in *Gossypium hirsutum* [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2018. [李婕，2018. 陆地棉驱动蛋白轻链相关基因 *GhKLCR*1 的克隆及功能验证 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学.]

LIU P, NIE WF, XIONG XS, et al., 2021. A novel protein complex that regulates active DNA demethylation in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 63(4): 772-786.

LI WJ, 2016. Cloning and Interaction Analysis of MAP Kinases in *Arabidopsis thaliana* [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016. [黎文进，2016. 拟南芥 MAP 激酶基因克隆及相互作用研究 [D]. 兰州：兰州大学，2016.]

OHNO S, UENO M, DOI M, 2020. Differences in the *CaMYBA* genome between anthocyanin-pigmented cultivars and non-pigmented cultivars in pepper (*Capsicum annuum*) [J]. The Horticulture Journal, 89(1): 30-36.

REN YB, MIAO M, MENG Y, et al., 2018. DFR1-mediated inhibition of proline degradation pathway regulates drought and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Cell Reports, 23(13): 3960-3974.

REN YL, ZHAO Y, ZHAO CZ, et al., 2022. Identification and bioinformatics analysis of *WD*40 gene family of *Meconopsis horridula* [J]. Guihaia, 42(9): 1561-1571. [任玉玲，赵艳，赵成周，等，2022. 多刺绿绒蒿 *WD*40 基因家族的鉴定及生物信息学分析 [J]. 广西植物，42(9)：1561-1571.]

SHAO FQ, LUO XR, WANG Q, et al., 2023. Advances in research of DNA methylation regulation during fruit ripening [J]. Acta Horticulturae Sinica, 50(1): 197-208. [邵凤清，罗秀荣，王奇，等，2023. 果实成熟过程中的 DNA 甲基化调控研究进展 [J]. 园艺学报，50(1)：197-208.]

SONG HX, 2022. The effects of editing the PI4P synthetase gene on blast-deterrent responses and photosynthesis activities in rice [D]. Taian: Shandong Agricultural University. [宋洪星，2022. 水稻磷脂酰肌醇 PI4P 合成酶基因编辑对抗瘟反应和光合作用的影响 [D]. 泰安：山东农业大学.]

VALENTINA M, MARINA M, ERNESTO G, 2012. On WD40 proteins: propelling our knowledge of transcriptional control? [J]. Epigenetics, 7(8): 815-22.

WANG HR, WANG JQ, ZHOU J, et al., 2024. Bioinformatics analysis and expression identification of *ZjRWD*40 gene family in *Ziziphus jujuba* cv. Dongzao [J/OL]. Molecular Plant Breeding: 1-16 [2024-10-27]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20241024.1520.005.html. [王惠冉，王嘉琪，周军，等，2024. 冬枣 *ZjRWD*40 基因家族的鉴定及表达特性分析 [J/OL]. 分子植物育种：1-16 [2025-02-14]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20241024.1520.005.html.]

WANG HR, DAI GL, DUAN LY, et al.,2024. Construction of cDNA three-frame expression library of Lycium barbarum and screening of upstream regulatory factors of *LbMLO*2 [J/OL]. Molecular Plant Breeding: 1-17 [2024-11-05]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20241028.1105.002.html. [王惠冉，戴国礼，段淋渊，等，2024. 枸杞 cDNA 三框表达文库构建及 *LbMLO*2 上游调控因子筛选 [J/OL]. 分子植物育种：1-17 [2025-02-14]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20241028.1105.002.html.]

YAN C, 2005. Study on the response mechanism of *Arabidopsis* WD-40 repeat proteins AtARCA and AtAGB1 to drought stress signals [D]. Yangzhou: Yangzhou University. [闫诚，2005. 拟南芥 WD-40 重复蛋白 AtARCA 和 AtAGB1 对干旱胁迫信号响应机理的研究 [D]. 扬州：扬州大学，2005.]

YANG D, WANG WL, FANG ZF, et al., 2024. Genome-wide analysis of the Phospholipase Ds in perennial ryegrass highlights LpABFs-*LpPLDδ*3 cascade modulated osmotic and heat stress responses [J]. Plant, cell &

environment, 48(2): 1115-1129.

YANG SZ, GAO LY, SUN XC, et al., 2015. Over-expressing *SlWD*6 gene to improve drought and salt tolerance of tomato [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 21(3): 413-420. [杨述章，高兰阳，孙晓春，等，2015. 过量表达 *SlWD*6 基因增强番茄抗旱和耐盐功能 [J]. 应用与环境生物学报，21(3)：413-420.]

YANG YC, JIN YR, LUO JC, et al.,2024. Identification and expression analysis of the *WD*40 gene family in pearl millet [J]. Acta Agronomica Sinic, 50(9): 2219-2236. [杨煜琛，靳雅荣，骆金婵，等. 珍珠粟 *WD*40 基因家族鉴定及表达特征分析 [J]. 作物学报，50(9)：2219-2236.]

ZHANG CY, 2013. The research on heritable epigenetic variation induced by drought stress and changes relative to physiological metabolism [D]. Changchun: Northeast Normal University. [张春玉，2013. 干旱胁迫诱导水稻产生可遗传表观遗传变异及其相关生理代谢变化的研究 [D]. 长春：东北师范大学.]

ZHANG JX, JIANG YF, LEI XN, et al., 2019. Research advances in Src and Abl tyrosine protein kinase family involved in pathogenic microbial infection [J]. Microbiology China, 46(10): 2781-2786. [张佳鑫，蒋一凡，雷昕诺，等，2019. Src 和 Abl 酪氨酸蛋白激酶家族参与病原微生物感染的研究进展 [J]. 微生物学通报，46(10)：2781-2786.]

ZHANG K, SI BB, ZHOU J, et al., 2023, Construction of cDNA library of apple rootstock ‘Qingzhen 1’ leaf and screen of *MdMLO* genes’ upstream regulator [J]. Acta Horticulturae Sinica, 50(5): 933-946. [张琨，思彬彬，周军，等，2023. 苹果砧木‘青砧 1 号’叶片 cDNA 文库构建及 *MdMLO* 上游调控因子的筛选 [J]. 园艺学报，50(5)：933-946.]

ZHANG K, 2022. Molecular identification of apple resources resistance to powdery mildew and preliminary study on the function of *MLO* resistance genes [D]. Yinchuan: North Minzu University. [张琨，2022. 苹果抗白粉病资源分子鉴定及 *MLO* 抗白粉病基因功能分析 [D]. 银川：北方民族大学.]

ZHANG L, ZONG N, LIU K, et al., 2021. The functional analysis of *Solanum lycopersicum* WD40 family *SlWDR204* in regulating plant morphogenesis [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 48(1): 40-45. [张琳，宗宁，刘奎，等，2021. 番茄 WD40 家族 *SlWDR204* 调控植株形态建成的功能分析 [J]. 安徽农业大学学报，48(1)：40-45.]

ZHANG M, YANG LL, JIA YL, et al., 2022. Research progress in the roles of DNA and histone methylations in epigenetic regulation [J]. Biotechnology Bulletin, 38(7): 23-30.[张淼，杨露露，贾岩龙，等，2022. DNA 甲基化和组蛋白甲基化修饰的表观遗传调控作用研究进展 [J]. 生物技术通报，38(7)：23-30.]

ZHAO Y, LI X, REN YL, et al., 2022. Identification and evolutionary analysis of *WD*40 gene family of *Corydalis hendersonii* with full-length transcriptome [J]. Molecular Plant Breeding, 20(24): 8112-8121. [赵艳，李雪，任玉玲，等，2022. 基于全长转录组数据的尼泊尔黄堇 *WD*40 基因家族鉴定及进化分析 [J]. 分子植物育种，20(24)：8112-8121.]